

POROVNÁNÍ METOD ÚPRAVY VZORKŮ PRO STANOVENÍ MAKROPRVKŮ V MLÉCE TECHNIKOU ICP-OES A COMPARISON OF SAMPLE PREPARATION METHODS FOR THE DETERMINATION OF MACROELEMENTS IN MILK BY ICP- OES

Jakub Křikala, Pavel Diviš, Jaromír Pořízka

Abstract: The aim of this methodological study was to compare several commonly used methods such as slurry dispersion, alkaline solubilisation, wet ashing, dry ashing and microwave assisted ashing for sample pre-treatment before ICP-OES analysis. A reference material ERM[®] – BD150 with certified values of monitored macro elements (Ca, K, Mg, Na and P) was used as a model milk matrix for sample preparation. The moisture content of the certificate reference material was determined by Karl-Fisher titration and the value found to be $11,5 \pm 2,3$ %. The most corresponding recoveries for Ca ($94,9 \pm 7,0$ %) and Mg ($113,7 \pm 5,5$ %) were achieved using Triton X-100 agent which promotes the solubilisation of milk matrix during sonication. The most relevant results to certified values of another macro elements were achieved using wet ashing for K, Na and P determination ($92,1 \pm 3,0$ %, $105,9 \pm 6,5$ % and $102,7 \pm 1,2$ % respectively). The ashing methods present good accuracy so they appear to be suitable for routine sample preparation before analysis, but further optimization of sample pretreatment in combination with instrument operating parameters for Ca and K determination in milk is necessary.

Keywords: Pre-treatment methods, macro elements, ashing, milk, Karl-Fisher titration, ICP-OES

ÚVOD

Minerální látky, zejména makroelementy, zastupují v lidském organismu důležitou roli, neboť jsou nedílnou součástí celé řady metabolických procesů a reakcí na buněčné úrovni. Obsah hlavních makroelementů v lidském těle činí asi 0,01 % tělesné váhy, přičemž zejména u dětí a dospívajících se doporučena denní dávka vápníku, draslíku a sodíku pohybuje v rozmezí 1,3 – 4,7 g kvůli jejich správnému vývinu a růstu kosterní soustavy (Zamberlin, et al., 2012). V tomto případě se mléko a mléčné výrobky jeví jako vhodný zdroj makroprvků jakožto i dalších důležitých nutrientů. Při technologickém zpracování syrového mléka však může vlivem dílčích procesů, např. standardizace obsahu tuku nebo ultrafiltrace, dojít ke snížení obsahu makroelementů, tudíž je důležité monitorovat jejich obsah nejen během výrobního procesu, ale i ve finálních produktech pro zajištění deklarované nutriční hodnoty.

Vzhledem k tomu, že mléko je poměrně komplikovaná matrice obsahující kromě vody a prvků celou řadu dalších chemických látek, je při jeho analýze běžnými instrumentálními metodami kritickým krokem vhodná úprava vzorku (Bylund, et al., 2003). Mezi tradiční mineralizační metody patří rozklad na suché cestě, jehož účinnost je však ovlivněna celou řadou faktorů, např. teplotou a dobou rozkladu či použitím vhodného činidla pro rozpuštění popele. Rozklady na mokré cestě a za použití mikrovln (MW) jsou pak založeny na oxidačních reakcích za zvýšené teploty a tlaku při použití koncentrovaných kyselin či jejich směsí s oxidačními činidly (Khan, et al. 2014; Moreno-Torres, et al. 2000). V literatuře je taktéž hojně diskutováno využití různých organických surfaktantů (např. EDTA, TMAH či Triton X-100) v kombinaci se sonikací za účelem lepší solubilizace vzorku či analýza disperze připravené prostým naředěním či okyselením matrice. Při těchto metodách je však nutné před analýzou ICP-OES přefiltrovat připravené vzorky, aby nedošlo k zanesení či ucpání zmlžovače při tvorbě aerosolu (Sola-Larrañaga, et al., 2009).

MATERIÁL A METODY

Všechny vzorky byly připraveny z referenčního materiálu ERM[®] – BD150 (Geel, Belgie) s certifikovanými hodnotami analyzovaných makroprvků. Referenční materiál pro přípravu vzorků byl vážen na analytických vahách Entris (Sartorius, Ústí n/L, ČR). Při experimentech a přípravě kalibrační křivky byla používána ultračistá deionizovaná voda z jednotky Purelab[®] Classic (ELGA, High Wycombe, UK). Z chemikálií byly použity 67% (w/w) HNO₃ Analpure[®], 96% (w/w) H₂SO₄ p.a. (ANALYTICA[®], Praha, ČR), 25% (w/w) TMAH vodný roztok, Triton[™] X-100, Methanol Chromasolv[®] (Sigma, Darmstadt, Německo) a 30% H₂O₂ (VWR, Radnor, USA). Pro kalibraci byly použity certifikované referenční materiály AN9091MN Astasol[®] (ANALYTICA[®], Praha, ČR) při stanovení Ca, K, Mg, Na a Certipur[®] ICP standard (Merck, Darmstadt, Německo) při stanovení P. Vzorky byly měřeny na přístroji ICP-OES Ultima 2 (HORIBA), Kjóto, Japonsko), jehož pracovní nastavení je uvedeno v tabulce 1, a výsledky byly zpracovány v programu MS Excel (Microsoft, Redmont, USA).

Obsah vlhkosti v referenčním materiálu byl stanoven pomocí Karl-Fisherovy titrace na přístroji Titrino (Metrohm, Herisau, Švýcarsko) na základě rovnice (1):

$$w = \frac{(w_v - w_b) \cdot m_0}{m_x}, \quad (1)$$

kde w je vlhkost referenčního materiálu [%], w_v a w_b jsou obsahy vody v metanolicím extraktu vzorku [%], respektive slepém pokusu [%]. Hodnota m_0 je hmotnost odváženého referenčního materiálu s 20 ml methanolu a m_x značí navážku referenčního materiálu. Při měření vlhkosti byl přefiltrovaný vzorek metanolickeho extraktu pipetován přímo do titrační cely titrátoru. Při přípravě vzorků byla vždy navážka cca 30 mg ($\pm 0,1$ mg) referenčního materiálu doplněna deionizovanou vodou do 50 ml. Při přípravě disperze byla navážka nejprve rekonstituována v 1 ml deionizované vody a vzorek byl po naředění 5 min sonifikován v ultrazvukové lázni. V případě okyselené disperze pak byla přidána konc. HNO₃ do finální koncentrace 1 mol/l. Před analýzou ICP-OES pak byly vzorky disperze přefiltrovány přes mikrofiltr o pórovitosti 0,45 μ m. Při použití organických činidel byl k rekonstituovanému materiálu přidán Triton X-100 v poměru ku navážce 1:1 [μ l:mg], popř. TMAH v poměru 1:0,3 [μ l:mg] a vzorek byl po naředění opět krátce sonifikován; v případě použití činidla TMAH po 30-ti minutovém zahřevu při 80 °C. Při mokřím rozkladu bylo k navážce přidáno 10 ml konc. HNO₃, vzorek byl zahříván ve vodní lázni při 100 °C po dobu 30 minut a poté doplněn do 50 ml. Při rozkladu na suché cestě byla navážka 2 hodiny žihána v elektrické peci při 500 °C a popílek byl následně rozpuštěn v 1M HNO₃. Mikrovlnný rozklad spočíval v mineralizaci navážky za zvýšené teploty a tlaku působením 8 ml směsi HNO₃:H₂O₂ = 3:1 v 5-ti krokovém programu (2 min. 250W – 2 min. 0W – 2 min. 250W – 5 min. 500W – 5 min. 0W) a naředění do 50 ml.

Tabulka 1 Pracovní nastavení přístroje ICP-OES

Příkon generátoru [W]	1 250
Peristaltická pumpa [ot./min]	16
Průtok na zmlžovači [ml/min]	0,82
Tlak na zmlžovači [bar]	3,01
Konfigurace hlavice	radiální
Čistota pracovního argonu [%]	99,996
Průtok plazmového plynu [l/min]	13,50
Průtok stínícího plynu [l/min]	0,70
Průtok pomocného plynu [l/min]	0,25
Vlnové délky [nm]	Ca: 393,366 (II) K: 766,490 (I) Mg: 285,213 (I) Na: 588,995 (I) P: 214,915 (I)

VÝSLEDKY A DISKUSE

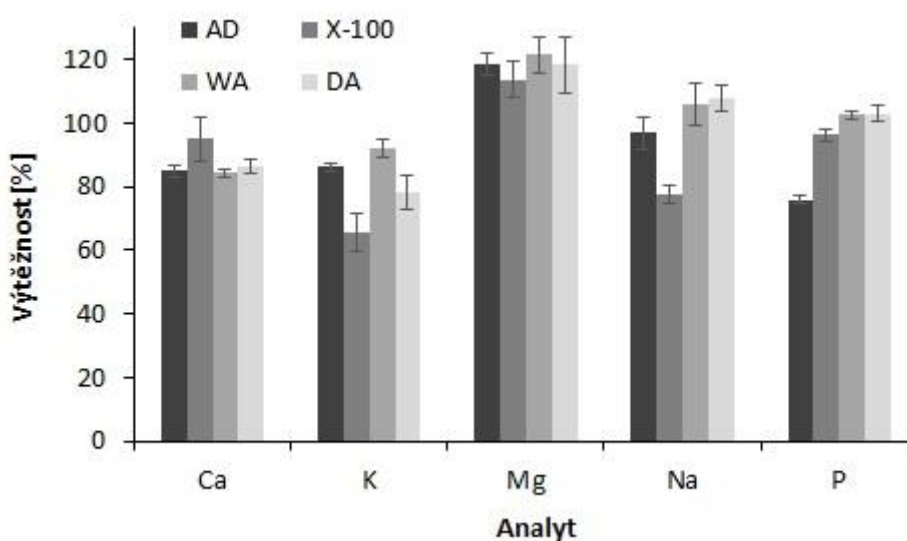
Cílem této práce bylo porovnání účinnosti uvedených metod úpravy vzorku při stanovení obsahu makroprvků v mléčné matrici technikou ICP-OES. Karl-Fisherovou titrací byla stanovena vlhkost certifikovaného referenčního materiálu $11,5 \pm 2,3$ %, tudíž veškeré dosažené výsledky byly vztaženy na obsah sušiny ve vzorku. V tabulce 2 je pak uveden přehled výtěžností stanovovaných makroprvků při různých metodách úpravy vzorku. Každý analyt byl vždy proměřen v 10 nezávislých replikátech, přičemž nejistota měření je vyjádřena jako konfidenční interval na hladině spolehlivosti 95 %.

Tabulka 2 Přehled výtěžnosti makroprvků z referenčního materiálu při různých metodách úpravy vzorku [%]

Analyt	Disperze (H₂O/HNO₃)	Činidla (Triton/TMAH)	Mokrá cesta	Suchá cesta	MW rozklad
Ca	87,1 ± 4,7/ 84,8 ± 2,1	94,9 ± 7,0/ 86,9 ± 7,1	84,03 ± 1,3	86,5 ± 2,3	82,5 ± 8,7
K	85,9 ± 5,8/ 86,3 ± 1,2	65,7 ± 6,1/ 87,8 ± 11,1	92,1 ± 3,0	78,2 ± 5,2	92,1 ± 8,9
Mg	118,7 ± 5,1/ 118,5 ± 3,4	113,7 ± 5,5/ 159,1 ± 11,2	121,3 ± 5,5	118,2 ± 8,8	116,2 ± 9,0
Na	102,0 ± 5,8/ 96,9 ± 5,1	77,5 ± 2,7/ 108,2 ± 10,8	105,9 ± 6,5	107,8 ± 4,0	87,0 ± 8,1
P	101,8 ± 4,4/ 75,9 ± 1,4	96,2 ± 2,0/ 99,7 ± 6,2	102,7 ± 1,2	102,8 ± 2,5	103,4 ± 9,1

Z výsledků je patrné, že největší přesnost a opakovatelnost ($CI_{95\%} < 6,5$ %) byla dosažena při analýze prosté disperze a vzorků rozložených na mokré cestě. Přímá analýza naředěného vzorku se sice z hlediska přípravy jeví jako nejvhodnější metoda pro stanovení Mg, Na a P, avšak při měření stanovení Ca a K může v tomto případě dojít ke ztrátám analytu v důsledku odfiltrování micel z roztoku či jejich odseparování v mlžné komoře. Po okyselení disperze sice byla experimentálně zjištěna nejlepší opakovatelnost, avšak došlo ke značnému poklesu výtěžnosti fosforu, neboť působením HNO₃ došlo k vysrážení bílkovin, zejména kaseinu, ve kterém je vázán určitý podíl přítomných makroprvků, zejména Ca a P (Zamberlin, et al., 2012). Největší odchylky od certifikovaných hodnot makroprvků v referenčním materiálu,

především při stanovení K, Na a Mg, byly zjištěny při rozkladu vzorku pomocí činidla TMAH pravděpodobně kvůli jeho čistotě, což je diskutováno v literatuře (Ribeiro, et al., 2003). Z grafického znázornění na obrázku 1 je patrné, že při stanovení makroprvků v mléce technikou ICP-OES nejsou mezi vybranými metodami úpravy vzorku statisticky významné rozdíly, vyjma stanovení fosforu při přímé analýze okyselené disperze a draslíku se sodíkem při použití činidla Triton X-100. Výrazně zvýšená výtěžnost (více než 110 %) při všech provedených experimentech byla zjištěna při stanovení Mg, proto budou v tomto případě vhodné další testy s odlišným nastavením přístroje ICP-OES, např. snížení tlaku na zmlžovači či příkonu do plazmového výboje z důvodu nižší hodnoty ionizačního potenciálu. Výraznější odchylky jednotlivých výtěžností makroprvků od certifikovaných hodnot v referenčním materiálu mohou být také důsledkem nižší návázký při experimentech, neboť konkrétně u referenčního materiálu ERM® – BD150 je pro přípravu vzorků při doporučená hmotnost minimálně 200 mg při stanovení makroprvků.



Obrázek 1 Porovnání účinnosti vybraných metod úpravy vzorku (*AD* = disperze s 1M HNO_3 , *X-100* = Triton X-100, *WA* = rozklad na mokré cestě, *DA* = rozklad na suché cestě)

ZÁVĚR

V této pilotní práci byla porovnávána účinnost metod úpravy vzorku při analýze makroprvků v mléce technikou ICP-OES. Přímá analýza disperze připravené prostým ředěním je sice z časového a ekonomického hlediska nejméně náročná, avšak hrozí zde riziko ucpání zmlžovače. Z hlediska opakovatelnosti se nejlépe jeví mineralizační metody, zejména na mokré a suché cestě, nicméně tyto postupy jsou pro změnu časově a ekonomicky náročnější. Při výběru vhodné metody pro přípravu vzorku je tedy třeba zvážit celou řadu faktorů a na základě dostupného vybavení a požadavků najít optimální poměr mezi účinností, opakovatelností a náročností experimentu.

LITERATURA

- Bylund., G., 2003. *Dairy processing handbook*.
- Khan, N., Ch. Ji Yeon, N. Eun Yeong, H. In Min, H. Girum, K. Murad Ali, P. Kyung Su, Su K. Kyong, 2014. Determination of Mineral Elements in Milk Products by Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry. *Analytical Letters*, **47**(9), 1606-1613.
- Moreno-Torres R., M. Navarro, M. D. Ruóz-López, R. Artacho, C. López, 2000. A Mineralization Procedure for Determining Magnesium in Milk. *LWT - Food Science and Technology*, **33**(5), 397-400. ISSN 00236438.
- Ribeiro A. S., A. L. Moretto, M. A. Z. Arruda, S. Cadore, 2003. Analysis of Powdered Coffee and Milk by ICP OES after Sample Treatment with Tetramethylammonium Hydroxide. *Microchimica Acta*, **141**(3-4), 149-155. ISSN 00263672.
- Sola-Larrañaga C., I. Navarro-Blasco, 2009. Optimization of a slurry dispersion method for minerals and trace elements analysis in infant formulae by ICP OES and FAAS. *Food Chemistry*, **115**(3), 1048-1055. ISSN 03088146.
- Zamberlin Š., N. Antunac, J. Havranek, D. Samaržija, 2012. Mineral elements in milk and dairy products. *Mljekarstvo*, **62**(2), 11-125.

Kontaktní adresa: Ing. Jakub Křikala, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií; Purkyňova 464/118, 612 00 Brno; Email: Jakub.Krikala@vut.cz
doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D., Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií; Purkyňova 464/118, 612 00 Brno; Email: divis@fch.vut.cz
Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D., Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií; Purkyňova 464/118, 612 00 Brno; Email: porizka@fch.vut.cz

Vedecký výbor konferencie:

prof. Ing. Norbert Lukáč, PhD., SPU Nitra
prof. Ing. Jozef Golian, Dr., SPU Nitra
prof. Ing. Mária Angelovičová, CSc., SPU Nitra
prof. MVDr. Jozef Bíreš, DrSc., ŠVPS SR Bratislava
prof. dr hab. inž. Lesław Juszczak FFT, UR Krakow, PL
Dr. hab. inž. Agnieszka Filipiak-Florkiewicz, FFT, UR Ktakov, PL
prof. Ing. Alžbeta Jarošová, CSc., MU Brno, ČR
doc. MVDr. Bohuslava Tremlová, CSc., VFU Brno, ČR
prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D., VFU Brno, ČR
doc. Ing. Lenka Kouřimská, Ph.D., ČZU Praha
prof. Ing. Ján Šajbidor, DrSc., STU Bratislava
prof. Ing. Peter Šimko, DrSc., STU Bratislava
prof. Ing. Ľubomír Valík, PhD., STU Bratislava
doc. RNDr. Peter Siekel, CSc., VÚP Bratislava
doc. Ing. Roman Labuda, PhD., University of Veterinary Medicine Vienna, Rakúsko
prof. Tadeusz Trziszka, Ph.D., D.Sc. Wrocław University, PR
prof. Dr. Irina Chernukha, Russian Meat Research Institute, Moscow
doc. MVDr. Slavomír Marcinčák, PhD., UVLF Košice
prof. MVDr. Jozef Nagy, PhD., UVLF Košice
doc. MVDr. Josef Kameník, CSc., VFU Brno, ČR
prof. Ing. Stanislav Kráčmar, DrSc., VŠOH Brno, ČR
doc. Ing. Aleš Rajchl, Ph.D., VŠCHT Praha, ČR
doc. Ing. Helena Čížková, Ph.D., VŠCHT Praha, ČR
doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D., VUT Brno, ČR
doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D., Univerzita Pardubice, ČR
doc. MVDr. Jan Bardoň, Ph.D., SVÚ Olomouc, ČR
prof. Ing. Dana Tančinová, PhD., SPU Nitra

Recenzenti:

doc. Ing. Martina Fikselová, PhD..
prof. Ing. Jozef Golian, Dr.
prof. Ing. Marcela Capcarová, PhD.
doc. Ing. Andrea Mendelová, PhD.,

Vydavateľ: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, vydanie: prvé, rok vydania: 2020

Schválila rektorka Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre, dňa 18. 5. 2020.
ako online zborník prác z vedeckej konferencie.

Neprešlo redakčnou úpravou vo Vydavateľstve SPU v Nitre. Za odbornú a jazykovú úpravu zodpovedajú autori.

ISBN 978-80-552-2168-7

This work is published under the license of the Creative Commons Attribution 4.0 International Public License (CC BY 4.0).
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode>



DOI: <https://doi.org/10.15414/2020.9788055221687>